

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2008～2011

課題番号：20241032

研究課題名（和文）

エピジェネティクス解析のための1分子ゲノムDNAメチル化検出デバイスの開発

研究課題名（英文）

Development of single genome DNA methylation detection device for epigenetics analysis

研究代表者

馬場 嘉信 (BABA YOSHINOBU)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：30183916

研究成果の概要（和文）：現状では達成不可能な PCR 不要、超簡便、超高感度メチル化 DNA 検出方法の開発に成功した。具体的にはマイクロ・ナノデバイスにより単一 DNA 伸長方法を開発し、メチル化領域の高感度検出のために量子ドット-メチル化認識タンパク複合体の合成に成功した。これらを併用した手法の開発により現状では達成不可能な、PCR 不要、簡便、超高感度かつ、メチル化部位の位置特定まで可能とする手法の開発に成功した。

研究成果の概要（英文）：We successfully developed novel DNA methylation analysis method. Our method elongates single DNA by flow or nanospace in the microfluidic device and detect methylation site with methylation point specific quantum-dots. Therefore, we need no troublesome procedures like PCR and can identify the location of methylation site as well as can detect methylation in single molecule level, which cannot attain by current methylation analysis method. These advantages would permit our method to be applied for medical diagnosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	12,200,000	3,660,000	15,860,000
2009年度	8,900,000	2,670,000	11,570,000
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
総計	37,300,000	11,190,000	48,490,000

研究分野：ナノバイオデバイス

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：エピジェネティクス、マイクロ・ナノデバイス、DNA伸長、1分子計測

1. 研究開始当初の背景

がんをはじめとした生活習慣病の診断には、従来、1塩基多型 (SNPs) など先天的なゲノム変化の検出に精力が注がれてきた。しかし、生活習慣病リスクの高い成人・高齢者においては、環境因子・生活習慣などによる後天的なゲノム変化であるエピジェネティクスを解析することが特に重要であることが最近明らかにされてきている。このように、エピジェネティクス解析の重要性は認識されているにも関わらず、その解析手法は煩雑な行程と多大な時間を必要するために、簡便、

高速、高感度、精確なエピジェネティクス解析手法の開発が期待されている。

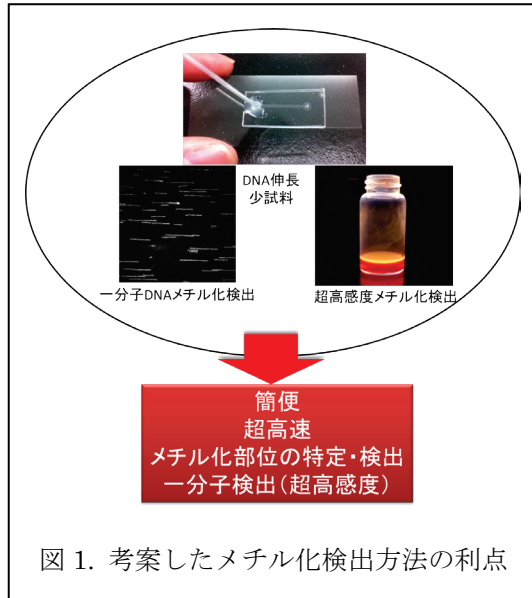
2. 研究の目的

現状のエピジェネティクス解析、特にメチル化解析の問題点は、PCRをはじめとする煩雑な操作が必要であること、bisulfite処理のように試料の損傷を招くこと、感度不足のために濃縮・増幅が必要なことである。そこで、単一 DNA の可視化方法、単一 DNA の伸長方法、単一 DNA のメチル化検出、メチル化部位特定方法を新規のマイクロ流体デバイ

ス、新規の蛍光試薬、光学機器の開発により達成し、現状のメチル化検出・解析方法の問題点を解決し、さらに高性能化を目指すものである。

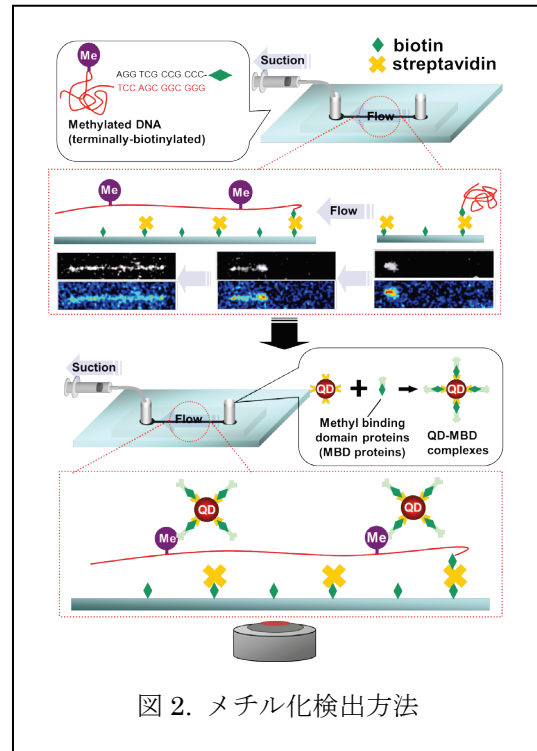
3. 研究の方法

我々が考案した特徴は図1に示す通りであり、概要は以下および図2の通りである



(1) 一分子 DNA の伸長方法の研究
濃縮・増幅の操作を不要とし、簡便化するには、単一分子の検出により達成可能である。また、メチル化の部位特定には DNA の伸長化が重要である。そこで、我々は、ナノ・マイクロ流体デバイスによる流体あるいはナノ空間を利用し、単一 DNA 分子の伸長・可視化を可能とする方法の開発を実施した。

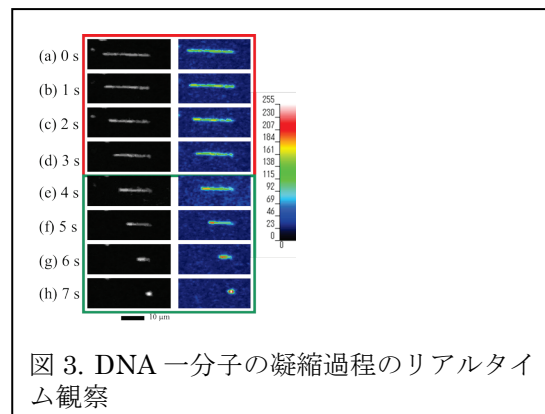
(2) メチル化部位の高感度検出試薬の開発
メチル化部位の特定・検出には、メチル化部位に特異的に結合する蛍光試薬が必須である。我々は蛍光試薬として、光退色しにくく、高輝度、サイズにより蛍光波長可変という特性を有する量子ドット(QD)に着目し、これを検出試薬に利用した。この量子ドットにメチル化部位認識能を付与するためにメチル化 DNA 結合タンパク(MBD)を量子ドットに結合させた QD-MBD を作製し、メチル化部位の高感度検出を実施した。また、この QD-MBD による蛍光検出の精度向上のために、蛍光フィルターの設定等の光学検出の改良を実施した。



4. 研究成果

(1) 一分子 DNA の伸長方法の開発

マイクロ流体デバイス、DNA の末端修飾法、マイクロ流体デバイスの表面改質方法の開発により、DNA の末端のみをデバイス表面に固定化することに成功するとともに、流体存在下、DNA の伸長・凝縮に成功した。また、その過程の一分子蛍光観察を実施し、DNA の伸長・凝縮の過程をリアルタイムで観察することに成功した (図3)。



また、マイクロ流体デバイス中にナノ流路を作製し、その中に DNA を導入することにより、一分子 DNA の伸長・検出に成功した。(図4)

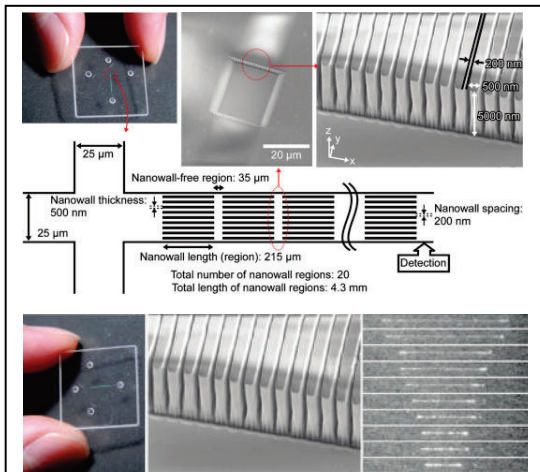


図4 ナノ流路による一分子 DNA の伸長・可視化

一方で、マイクロ流体デバイスを利用しない一分子 DNA 伸長・可視化も並行して検討し、molecular combing 法により、一分子 DNA の伸長・可視化に成功した。(図 5)

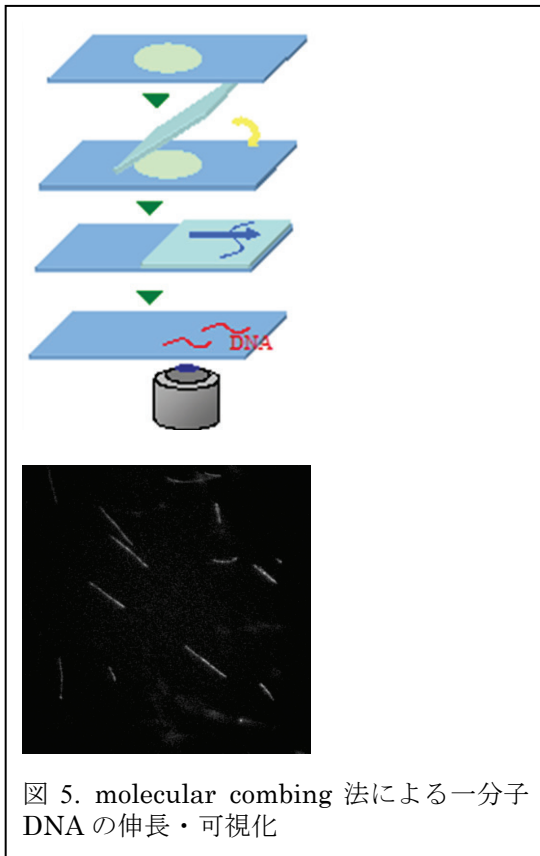


図 5. molecular combing 法による一分子 DNA の伸長・可視化

(2)メチル化部位の高感度試薬の開発
1 分子 DNA のメチル化部位の高感度検出のためにメチル化 DNA 結合タンパク質固定化量子ドットの作製を実施した。その作製および精製の確認のために、ゲル電気泳動法およびゼータ電位測定装置を利用した。その結果、

電気泳動移動度(移動距離)の変化およびゼータ電位の変化より、メチル化 DNA 結合タンパク質の量子ドットへの固定化が示唆される結果を得た。さらに確認を得るためにメチル化 DNA 結合タンパク質を蛍光ラベリングし、電気泳動した結果から、メチル化 DNA 結合タンパク質が量子ドットに固定化されたことを実証した。さらに、磁気ビーズを用いた結果から、メチル化 DNA 結合タンパク質固定化量子ドットのみを分取可能であることを証明した(図 6)。

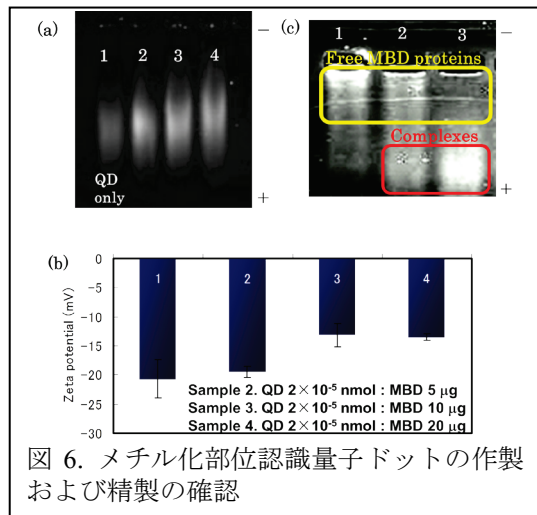


図 6. メチル化部位認識量子ドットの作製および精製の確認

(3) マイクロ流体デバイスとメチル化認識量子ドットの併用による新規メチル化検出方法

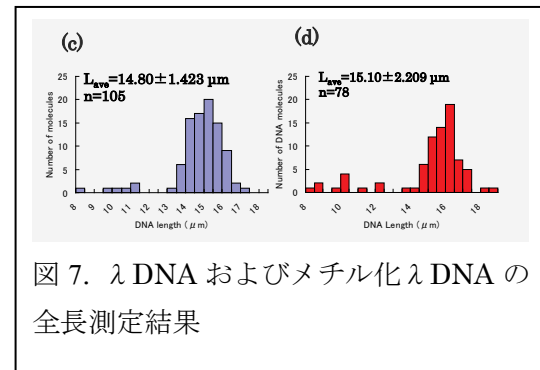


図 7. λ DNA およびメチル化 λ DNA の全長測定結果

これまでに開発した技術を用いて、一分子メチル化 DNA の検出・解析を試みた。我々の方法は、未処理の λ DNA およびメチル化された λ DNA の切断を伴うことなく伸長可能なために(図 7)、現状の bisulfite 法を利用した手法と比較し、メチル化マッピングに使用可能であることを明らかとした。

さらに、メチル化 λ DNA の伸長下、メチル化 DNA 結合タンパク質固定化量子ドットを用いて、一分子メチル化 DNA の検出を試みた。その結果、図 8 に示すように、メチル化 λ DNA には 5 個のメチル化サイトがあるが、それを

正確に認識し、検出することに成功した。

また、この輝点が同一のメチル化 DNA 由来のものであることを確かめるために、光学系の調整を行った。その結果、YOYO-1 染色された同一メチル化 DNA 上に量子ドットの輝点が観測された(図 9)。さらに、輝点間の距離は、予測されるメチル化間の距離と合致した(表 1)。以上の結果より、我々の手法は PCR などの煩雑な操作を不要とし、一分子レベルという超高感度にしかも正確にメチル化の検出・解析を可能とした。さらに、我々の手法は試料 DNA の断片化を生じないために、メチル化のマッピングも可能であるという現状にはない超高性能なメチル化検出・解析方法であることを実証した。

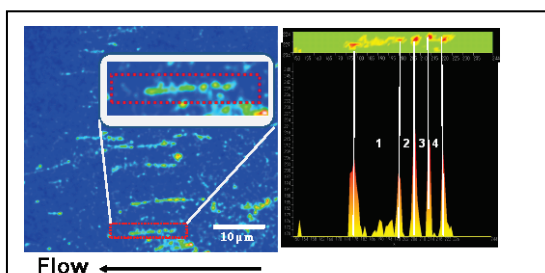


図 8. 一分子メチル化 λ DNA の蛍光検出および輝点解析

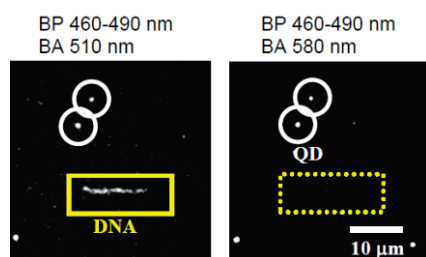


図 9. 同一メチル化 λ DNA よりの蛍光検出の確認

表 1. メチル化ポイント間の理論および実測距離

Relative distance (calculated value)	0.45	0.16	0.18	0.2
Relative distance (measured value)	0.50	0.19	0.15	0.15

このように、我々の開発した手法は、現状のメチル化検出・解析法と比較し、優位であることは明らかであるが、メチル化検出には全反射蛍光顕微鏡という特殊な顕微鏡を必要としている。また、DNA は解析前に末端固定化のための前処理が必要である。そこで、今後は診療所でもその場解析可能とするために、我々が DNA の伸長方法で検討した、ナノ流路を利用した方法あるいは molecular

combining を利用した手法をキット化し、簡便に DNA の伸長を可能とするとともに、検出系に関しても、一分子観察を可能とする蛍光試薬・検出法の検討を実施していく予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

- ① Ken Hirano, Masatoshi Ichikawa, Tomomi Ishido, Mitsuru Ishikawa, Yoshinobu Baba, Kenichi Yoshikawa, How environmental solution condition determine the compaction velocity of single DNA molecules, *Nucleic Acids Research*, **2012**,*40*, 284-289 (査読有), DOI: 10.1093/nar/gkr712
- ② T.Yasui, N. Kaji, R. Ogawa, S. Hashioka, M. Tokeshi, Y. Horiike and Y. Baba, DNA Separation in Nanowall Array Chips, *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 6635-6640. (査読有), DOI: 10.1021/ac201184t
- ③ Hiroshi Suzuki, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba Real-time observation of DNA conformational transitions at a single-molecule level by microfluidic devices, *Micro TAS 2010*,1880-1882 (査読あり), http://www.rsc.org/binaries/LOC/2010/PDFs/Papers/640_0167.pdf
- ④ Park, Yeon-Su; Dmytruk, Andriy; Dmitruk, Igor; Kasuya, Atsuo; Takeda, Motohiro; Ohuchi, Noriaki; Okamoto, Yukihiro; Kaji, Noritada; Tokeshi, Manabu; Baba, Yoshinobu, Size-selective growth and stabilization of small CdSe nanoparticles in aqueous solution, *ACS Nano*, **2010**,*4*, 121-128(査読有), DOI: 10.1021/nn901570m
- ⑤ Hiroshi Suzuki, Noritada Kaji, Yukihiro Okamoto, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, A single molecule analysis for the conformational transition of DNA using microfluidics, *Micro TAS 2009*, 827-829(査読有)
- ⑥ Daisuke Onoshima, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, Nuclease tolerant FRET probe based on DNA-quantum dot conjugation, *Anal Sci*, **2008**,*24*, 181-183 (査読有) https://www.jstage.jst.go.jp/article/analsci/24/2/24_2_181/_pdf

[学会発表] (計 33 件)

- ① Y. Baba, Nanobiodevice for single biomolecular and cellular analysis for cancer diagnosis and *in vivo* imaging for stem cell therapy, 37th International Symposium on High-Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques (HPLC 2011 Dalian), 2011年10月8日, Dalian, China
- ② Y. Baba, Nanobiodevice for single biomolecular and cellular analysis for cancer diagnosis and *in vivo* imaging for stem cell therapy, 2011 Gordon Research Conference on the Physics and Chemistry of Microfluidics, 2011年6月28日, Waterville Valley, USA
- ③ Jun Wang, Michihiko Aki, Daisuke Onoshima, Kenji Arinaga, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Shozo Fujita, Naoki Yokoyama, Yoshinobu Baba, Microfluidic sensor for the detection of DNA or protein by hybridization-based fluorescence enhancement or immunoassay-based fluorescence quenching, 14th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2010), 3-7 October 2010, Martiniplaza, Groningen, Netherlands
- ④ 鈴木博詞, 加地範匡, 岡本行広, 渡慶次学, 馬場嘉信 マイクロフルイディクスを利用した DNA 構造転移の 1 分子解析, 日本化学会第 89 春季年会, 2009 年 3 月 27-30 日, 日本大学理工学部船橋キャンパス
- ⑤ Kentaro Fujiyoshi, Noritada Kaji, Manabu Tokeshi, Yoshinobu Baba, In real-time monitoring of conformational transition of DNA at a single molecule level in microfluidic devices, The 12th international conference on miniaturized systems for chemistry and life sciences (μ TAS2008), 2008 年 10 月 12 日-16 日 San Diego, CA, USA

[図書] (計 8 件)

- ① 馬場嘉信, CMC 出版, 量子ドットおよび無機蛍光体, 蛍光イメージング・MRI プロブの開発, 2011, 8 ページ
- ② 加地範匡, 岡本行広, 渡慶次学, 馬場嘉信, エヌ・ディー・エス, バイオチップ実用化ハンドブック, 2010 総ページ 5
- ③ 岡本行広, 加地範匡, 渡慶次学, 馬場嘉信 メディカルドゥ, 医療に貢献するナノバイオ技術, 遺伝子医学 Mook 別「ますます重要になる細胞周辺環境の科学技術」 2009, 総ページ 8
- ④ 馬場嘉信, オーム社, ナノメディシン (ナノバイオイメージング・計測による予防医療), 2008 総ページ 11

[その他]

ホームページ等

<http://www.apchem.nagoya-u.ac.jp/III-2/baba-ken/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 嘉信 (BABA YOSHINOBU)
名古屋大学・工学研究科・教授
研究者番号: 30183916

(2) 研究分担者なし

(3) 連携研究者

渡慶次 学 (TOKESHI MANABU)
北海道大学・工学研究院・教授
研究者番号: 60311437
加地 範匡 (KAJI NORITADA)
名古屋大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 90402479
岡本 行広 (OKAMOTO YUKIHIRO)
名古屋大学・革新ナノバイオデバイス研究センター・特任講師
研究者番号: 50503918
張 勇 (YONG ZHANG)
名古屋大学・工学研究科・研究員
研究者番号: 40467329
汪 俊 (WANG JUN)
名古屋大学・工学研究科・研究員
研究者番号: 30543532
安井 隆雄 (YASUI TAKAO)
名古屋大学・工学研究科・助教
研究者番号: 00630584